

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-531532

(P2002-531532A)

(43)公表日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51) Int.Cl. ¹	識別記号	F I	マーク ¹ (参考)
A 61 K 38/00		A 61 K 9/06	4 C 0 7 6
9/06		9/08	4 C 0 8 1
9/08		9/70	4 0 1 4 C 0 8 4
9/70	4 0 1	47/48	
38/17		A 61 P 7/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 41 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願2000-586383(P2000-586383)
(86) (22)出願日 平成11年12月6日(1999.12.6)
(85)翻訳文提出日 平成12年8月4日(2000.8.4)
(86)国際出願番号 PCT/GB99/04094
(87)国際公開番号 WO00/33893
(87)国際公開日 平成12年6月15日(2000.6.15)
(31)優先権主張番号 9826897.2
(32)優先日 平成10年12月7日(1998.12.7)
(33)優先権主張国 イギリス(GB)

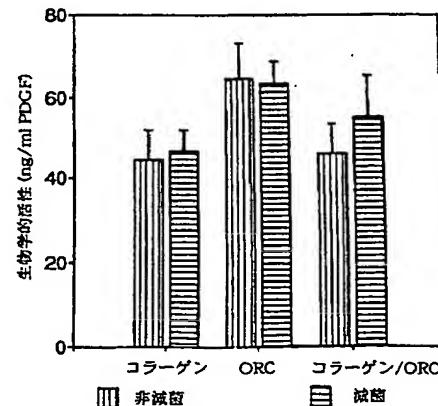
(71)出願人 ジョンソン・アンド・ジョンソン・メディカル・リミテッド
Johnson & Johnson Medical Ltd.
イギリス国、エジンバラ・イーエイチ2・4エヌエイチ、クイーン・ストリート・68-73、アースカイン・ハウス
(72)発明者 カレン・ブレダ
イギリス国、ビーディー23・1エイチアル・ノース・ヨークシャー、スキップトン、コンソート・ストリート7
(74)代理人 弁理士 田澤 博昭 (外1名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 ポリサッカライドと結合した治療ペプチドの滅菌複合体

(57)【要約】

本発明は、治療ペプチドと、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択されるポリサッカライドとの複合体を含み、複合体は電離放射線で滅菌されている滅菌組成物を提供する。驚くべきことに、ポリサッカライドの存在により、電離条件下、特にガンマ線照射下で、治療ペプチドが安定化され分解しなくなる。滅菌組成物の製造方法及び滅菌治療ペプチドの製造方法も示される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 治療ペプチドと、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択されるポリサッカライドとの複合体を含み、前記複合体は電離放射線で滅菌されている滅菌組成物。

【請求項2】 前記ペプチドが、成長因子、止血剤、抗微生物剤、抗バクテリア剤、抗付着剤及びコラーゲンフラグメントからなる群から選択される請求項1に記載の滅菌組成物。

【請求項3】 前記ペプチドが、ヒト分裂促進又は脈管形成活性を有する成長因子を含む請求項2に記載の滅菌組成物。

【請求項4】 前記成長因子が、線維芽細胞増殖因子（FGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF- α 、TGF- β_1 、TGF- β_2 ）、神経成長因子（NGF- α 、NGF- β ）、上皮細胞成長因子（EGF）、骨形態形成タンパク質、インシュリン様成長因子（IGF-I又はIGF-II）及びこれらの混合物からなる群から選択される請求項3に記載の滅菌組成物。

【請求項5】 前記組成物が、さらに、構造タンパク質、ポリアニオン性ポリサッカライド及びこれらの混合物からなる群から選択される生体ポリマーを含む請求項1乃至請求項4のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項6】 前記構造タンパク質が、天然コラーゲンタイプ、アテロコラーゲン、ペプシン可溶化コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン及びラミニンからなる群から選択される請求項5に記載の滅菌組成物。

【請求項7】 前記構造タンパク質が、本質的に天然繊維状コラーゲンからなる請求項6に記載の滅菌組成物。

【請求項8】 前記ポリサッカライドが、酸化セルロース、キトサン及びこれらの混合物と塩からなる群から選択される請求項1乃至請求項7のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項9】 前記ポリサッカライドが、酸化再生セルロース（以下「ORC」という）及び中和酸化再生セルロース（以下「nORC」という）からなる群から選択される請求項8に記載の滅菌組成物。

【請求項10】 前記組成物が、天然繊維状コラーゲン及びORCの混合物を含む請求項1乃至請求項9のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項11】 前記治療ペプチドの前記ポリサッカライドに対する重量比が、1:10⁶乃至1:10である請求項1乃至請求項10のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項12】 前記重量比が、1:10⁵乃至1:100である請求項1に記載の滅菌組成物。

【請求項13】 前記重量比が、1:10⁴乃至1:1000である請求項12に記載の滅菌組成物。

【請求項14】 前記組成物が、凍結乾燥又は溶媒乾燥スポンジを含む請求項1乃至請求項13のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項15】 さらに、フリーラジカル捕集剤を含む請求項14に記載の滅菌組成物。

【請求項16】 前記組成物が、ヒト又は動物の体に局所投与するための粘性液体又はゲルである請求項1乃至請求項15のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項17】 前記組成物が、ヒト又は動物の体に静脈内投与するための液体である請求項1乃至請求項15のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項18】 前記治療ペプチドとポリサッカライドが、固体担体の面上にコートされている請求項1乃至請求項13のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項19】 前記固体担体が、傷面に適用するのに適した織布又は不織布、ポリマーフィルム又はウェブである請求項18に記載の滅菌組成物。

【請求項20】 前記固体担体が、生物学的に吸収可能である請求項18又は請求項19に記載の滅菌組成物。

【請求項21】 前記固体担体が、織ORC布又は不織ORC布を含む請求項20に記載の滅菌組成物。

【請求項22】 前記滅菌組成物が滅菌パッケージされる請求項1乃至請求項21のいずれか一項に記載の滅菌組成物。

【請求項23】 治療ペプチドとポリサッカライドの複合体を準備し、前記複合体を滅菌し、次に、前記複合体を製薬的に許容可能な担体の中又は上に分散する工程を含み

前記ポリサッカライドは、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマノナン及びこれらの混合物からなる群から選択される滅菌治療組成物の製造方法。

【請求項24】 前記準備工程が、前記治療ペプチドを前記ポリサッカライドと共に溶媒中で混合し、次に、前記溶媒を除いて前記複合体を残すことを含む請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記溶媒が水性溶媒である請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記溶媒が、凍結乾燥又は溶媒乾燥により除かれる請求項24又は請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記滅菌工程が、電離放射線又はガスプラズマ処理により実施される請求項23乃至請求項26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】 前記電離放射線がガンマ線である請求項27に記載の方法

【請求項29】 前記複合体が、前記滅菌工程の間、4重量%より少い水を含む請求項23乃至請求項28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】 前記分散工程が、前記滅菌工程の後に無菌条件下で実施される請求項23乃至請求項29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】 請求項1乃至請求項22のいずれか一項に記載の滅菌組成物を製造するための請求項23乃至請求項30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】 治療ペプチドを準備し、前記治療ペプチドとポリサッカライドの間に複合体を形成し、前記複合体を滅菌し、次に、無菌条件下で前記複合体から前記治療ペプチドを分離して、前記滅菌治療ペプチドを得る工程を含み、前記ポリサッカライドは、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマノナン及びこれらの混合物からなる群から選択される滅菌治療組成物の製造方法。

ンナン及びこれらの混合物からなる群から選択される

滅菌治療ペプチドの製造方法。

【請求項33】 前記分離工程が、水性溶媒を用いて前記複合体から前記治療ペプチドを抽出することを含む請求項32に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、1以上の治療ペプチドを含む滅菌組成物に関する。また、本発明は、このような組成物の製造方法及び滅菌治療ペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【背景技術】

天然及び合成ペプチド化合物は、治療における活性剤として、その重要性が増大している。特に傷の治療のために、上皮細胞成長因子（E.G.F.）、線維芽細胞増殖因子（F.G.F.）、骨形態形成タンパク質、血小板由来成長因子（P.D.G.F.）及びトランスフォーミング増殖因子（T.G.F.）等の成長因子を使用することに特別の関心が寄せられている。成長因子は組換DNA合成技術により大量に利用できるようになり、このため、成長因子を投与するための滅菌製剤を必要とするようになった。

【0003】

ペプチドに基づく医薬品の特徴は、ほとんどのペプチドは、消化管で破壊されてしまうので、腸内投与に適さないということである。従って、ほとんどのペプチド医薬品は、非経口的に、特に局所又は静脈内投与により、投与しなければならない。このような投与方法のためには、ペプチド組成物が滅菌されていることが必須である。即ち、組成物は、生存能力のある微生物、ウイルス及びDNAフラグメントを実質的に含んではならない。

【0004】

治療ペプチドを含む組成物を滅菌しようとすると、困難が生じる。オートクレーブでの加熱又はガンマ線照射等の従来の滅菌方法では、特に水の存在下で滅菌するときは、治療ペプチドの生物学的活性がしばしば低下する。化学的滅菌剤は、ペプチドの酸化剤に対する感度、pHの変化、イオン強度の変化又は温度の変化により、やはり不適切である。エチレンオキシドによる滅菌も、エチレンオキシドと幾つかのペプチドとの反応性により、さらに、エチレンオキシドの残留が許容不可であること及び製品に含まれてしまうその有害な反応生成物により、不

適切である。

【0005】

過去において、ペプチドに基づく医薬品は無菌条件下で滅菌した出発材料から製剤していた。しかし、このような無菌製造はかなり高価で実施が難しい。ペプチドを含む溶液は限外ろ過で滅菌しているが、この方法は大分子を含む組成物又は固体又は半固体組成物には不適切である。

【0006】

EP-A-0238839は、トリプシン等の酵素を含浸させた吸収性セルロースシートを含む傷手当用品を示している。この傷手当用品は無菌条件下で製造して乾燥しているが、明らかに、その後に滅菌していない。

【0007】

EP-A-0312208は、ヒト分裂促進又は脈管形成活性を有するポリペプチド成長因子を含むゲル製剤を示している。このゲル製剤は傷に局所投与するのに適しており、セルロース誘導体を含んでいる。ポリペプチド成長因子を水溶液に保存すると通常生物学的活性が消失するが、セルロース誘導体はその消失が生じないようにポリペプチド成長因子を安定化できると記載されている。メチルセルロースとヒドロキシアルキルセルロース誘導体が好ましい。ペプチド成長因子を加える前にゲルを滅菌し、その後に、無菌条件下でペプチド成長因子を加える。従って、製剤した後では、組成物を滅菌していないと考えられる。同様の組成物がEP-A-0267015に記載されている。

【0008】

EP-A-0308238は、ポリペプチド成長因子を含む安定な凍結乾燥組成物を示している。凍結乾燥は、成長因子が水中で加水分解されて活性を失うのを防ぎ安定化する。凍結乾燥組成物は、水溶性又は水膨潤性ポリマー（例えば、セルロース誘導体）等の增量剤を含む。明細書には、滅菌された凍結乾燥製品を製造するために、成長因子以外の出発材料をオートクレーブで滅菌し成長因子は滅菌ろ過することが記載されている。この出願は、明らかに、最終凍結乾燥ペプチド組成物を滅菌することは意図していない。

【0009】

PCT国際公開第WO 95/02411号は、ポリペプチド成長因子を含む水性組成物を示しており、その成長因子は4°Cで長期間生化学的に安定である。この成長因子は、組成物を2.8乃至3.8の低いpHにすることにより安定化される。しかし、成長因子を含む組成物を滅菌することは明細書に記載されていない。

【0010】

EP-A-0437095は、酢酸ナトリウム溶液等でORCを処理する、中和酸化セルロース生成物(nORC)の製造方法を示している。この中和生成物を、スロンビン等の酸感受性止血剤で含浸させてその止血特性を高めてもよいし、組織プラスミノーゲン活性化因子(t-PA)等の酸感受性付着防止剤で含浸させてその付着防止特性を高めてもよい。他の実施形態では、この布を成長因子等の医薬品で含浸させている。

【0011】

ORCとn-ORCは両方共ガンマ線照射で滅菌でき、EP-A-0437095は、ヘパリン又はヘパリンフラグメントと複合するn-ORCもガンマ線照射で滅菌できることを示している。しかし、この文献は、ペプチドが結合しているORC又はn-ORCを滅菌することは示していない。

【0012】

EP-A-0562864は、コラーゲンスポンジマトリックス、第二の生物学的吸収可能ポリマー(例えば、酸化再生セルロース(ORC)の分散繊維)の基礎構造及び活性剤(例えば、ペプチド)を含む複合傷手当物質を示している。活性剤は、マトリックス又は基礎構造又は両方に存在できる。複合スポンジ物質をパッケージして滅菌できる。この文献に記載されている物質は本来的に不均質である。これらは、活性剤の相放出及び、好ましくは、指向性細胞内成長をもたらす繊維、フィルム又はフレークの基礎構造を含む。

【0013】

PCT国際公開第WO 98/00180号は、慢性の傷の治療のためにORCとコラーゲンの複合体を使用することを示している。明細書には、ORCが細胞成長因子と安定な複合体を形成することが記載されている。

【0014】

U S - A - 5 7 3 0 9 3 3 は、生物学的に活性なペプチドをその生物学的活性を消失することなくガンマ線又は電子ビーム照射で滅菌する方法を示している。この方法は、生物学的に活性なペプチドとゼラチン等の外来タンパク質を含む混合物を形成し、この混合物を凍結又は凍結乾燥し、次にこの混合物を照射する工程を含む。外来タンパク質の存在がペプチドを安定化して生物学的活性の消失を防ぐと述べられている。この混合物には、さらに、フリーラジカル捕集剤 (scavenger)を含ませて、照射安定性を一層高めてよい。この文献は、ポリサッカライドが照射の際ペプチドを安定化できることは示唆していない。

【0015】

【発明の開示】

本発明の目的は、滅菌した後もペプチドの生物学的活性が保持されるように生物学的に活性なペプチドを滅菌するための改善された方法を提供することである。

【0016】

本発明は、滅菌前にペプチドを有効量の選択されたポリサッカライドと共に製剤するなら、電離放射線で滅菌しても、ペプチド治療剤 (特に、成長ホルモン) の生物学的活性は消失しないで安定化するという驚くべき発見に基づいている。

【0017】

第一の側面では、本発明は、治療ペプチドと、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択されるポリサッカライドの複合体であって、電離放射線で滅菌された複合体を提供する。

【0018】

ペプチドは任意の治療的に活性なペプチドでよく、例えば、ホルモン、抗体、抗体フラグメント、天然及び合成ペプチド抗原及び抗原フラグメントである。好適なペプチドの例には、オキシトシン、バソプレシン、コルチコトロピン、アプロチニン、カルシトニン、プロラクチン、インヒビチン、インターフェロン、ソマトスタチン、インシュリン、グルカゴン、心房性ナトリウム排泄因子 (ANF) 、エンドルフィン、レニンインヒビター、黄体形成ホルモン放出ホルモン (L

H R H)、成長ホルモン放出ホルモン (G H R H)、ペプチドT又はその合成相
同体又は類似体がある。好ましくは、ペプチドは治療的に活性であって傷の治癒
を促す。好適なペプチドには、トロンビン等の止血剤、t-P A等の抗付着剤が
含まれる。また、コラーゲンフラグメント等の天然プロテインの治療フラグメン
トも含まれる。本発明は水溶性及び非水溶性ペプチドの両方に適する。ペプチド
はどのような分子量でもよいが、例えば1000乃至100000であり、好ま
しくは4000乃至60000である。

【0019】

好ましくは、ペプチドは、成長因子、より好ましくは、ヒト分裂促進又は脈管
形成活性を有する成長因子である。より好ましくは、成長因子は、線維芽細胞増
殖因子 (F G F)、血小板由来成長因子 (P D G F)、トランスフォーミング増
殖因子 (T G F- α 、T G F- β_1 、T G F- β_2)、神経成長因子 (N G F- α 、N G F- β)、上皮細胞成長因子 (E G F)、骨形態形成タンパク質、イン
シュリン様成長因子 (I G F-I 又は I G F-II) 及びこれらの混合物からな
る群から選択される。

【0020】

本出願人は、ポリサッカライドの特定のグループ (天然及び化学変性したもの
を含む) が電離放射線による滅菌に対してペプチドを安定化させるのに有効であ
ることを見出した。特定された有効なポリサッカライドは、(a) セルロース誘
導体、(b) キチン及びキトサン、及び(c) ガラクトマンナンである。ヒアル
ロン酸ナトリウム、ペクチン、 β -グルカン又はアルギン酸カルシウム等の他の
ポリサッカライドは、これらは滅菌の際ペプチドの生物学的活性を保護しないた
め、又はこれらが体内で生物学的に活性なペプチドを解離しないと予想されるた
め、好適ではない。ペプチド複合体をこのように滅菌した結果得られる滅菌生成
物は、高い生物学的活性と組成物内に存在する特徴的なイオン化破片により同定
できる。

【0021】

用語「セルロース誘導体」は全ての化学的に変性したセルロースを意味する。
好ましくは、変性セルロースは各100の糖残基に対し少なくとも1つのカルボ

キシレート基を有し、より好ましくは、カルボキシメチルセルロース、酸化セルロース又はこれらの塩を含む。

【0022】

酸化セルロースは、セルロースにある $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基の幾つかを二酸化窒素又は他の酸化剤で酸化して製造する。酸化セルロースは、簡単に組織面に適用できる生物学的に吸収可能な吸収性マトリックスを製造するのに使用できる。酸化再生セルロース(ORC)布は、これらが再生セルロース布(例えば、レーヨンタイプ布)を酸化処理して製造できるので、特に好ましい。このようなORCの例を2つ挙げると、INTERCEED(ジョンソン・アンド・ジョンソン・メディカル・インクの登録商標)とSURGICEL(ジョンソン・アンド・ジョンソン・メディカル・インクの登録商標)である。INTERCEED布は手術のとき付着パリヤとして使用する。SURGICEL布は手術及び他の用途で止血剤用品として使用する。ORCは、特にインビボにおける生物学的再吸収性と止血特性において、非変性セルロースに比べて、大きな利点を有する。

【0023】

好適なORCは、U.S.-A-3122479の方法により、又は市販のINTERCED(登録商標)又はSURGICEL(登録商標)布から、又はこのような布を粉碎して得た粉末又は纖維状形態で、製造できる。中和ORCはE.P.-A-0437095に記載されているように製造できる。低分子量ORCフラグメント(水溶性フラグメントを含む)はPCT国際公開第WO 98/00446号に記載されているようにORCをアルカリ加水分解して製造できる。

【0024】

キチン、キトサン及び一部が脱アシル化した全てのキトサン中間体も本発明に有効である。

【0025】

ガラクトマンナン、即ち、ガラクトースとマンノース残基の両方を含むポリサッカライドも本発明に有効である。好ましいガラクトマンナンの例はグアーゴムとイナゴマメゴムである。

【0026】

本発明に使用される治療的に活性なペプチドとポリサッカライドの複合体は、追加的に、他の天然又は半合成生体親和性ポリマーを上記のポリサッカライドと混合して含んでもよい。好適な追加的な生体ポリマーの例には、コラーゲン、フィブリン及びラミニン等の構造タンパク質、アテロコラーゲン又はペプシン可溶化コラーゲン等の変性構造タンパク質、セルロース、スターチ、アルギネート、変性スターチ又はムコポリサッカライド及びこれらの混合物等の他のポリサッカライドがある。好ましくは、追加的な生体ポリマーは、天然及び変性構造タンパク質及びポリアニオン性ポリサッカライドからなる群から選択される。用語「アニオン性ポリサッカライド」は、ヘパリン、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸塩、コンドロイチン硫酸塩及びこれらのフラグメントと塩等のムコポリサッカライドを含む。

【0027】

この明細書で使用する用語「構造タンパク質」は、コラーゲン及び他の構造タンパク質（例えば、フィブリン又はラミニン）を意味する。これらは、用語の普通の意味では治療的に活性なペプチドではない。このような構造タンパク質とアルギネートの複合体はU.S.-A-4614794に記載されている。このような構造タンパク質とO.R.Cの複合体はG.B.-A-2314842に記載されている。このような複合体は、傷治癒用途、特に慢性的傷の治療に効果を有する。好ましくは、構造タンパク質は、本質的に天然繊維状コラーゲンからなる。

【0028】

本発明のこの側面による組成物は、好ましくは、意図する用途に対する治療有効量のペプチドを含む。典型的には、傷に局所投与するための組成物の場合、0.1重量ppm乃至10, 000重量ppm、より好ましくは、1重量ppm乃至1, 000重量ppmの範囲である。好ましくは、組成物における治療ペプチドのポリサッカライドに対する重量比は1:10⁶乃至1:10、より好ましくは1:10⁵乃至1:100、最も好ましくは1:10⁴乃至1:1000である。

【0029】

治療ペプチドはポリサッカライドと複合する。即ち、治療ペプチドの分子のか

なりの部分がポリサッカライドの分子と共有結合、イオン結合、ファン・デル・ワールス結合で結合する。このことは、例えば、薄層を有孔性又は織物様ポリサッカライド基体上にコートすることにより、又は、ペプチドとポリサッカライドを密接に混合することにより達成できる。好ましくは、治療ペプチドはポリサッカライドと共有結合しない。

【0030】

本発明に使用するポリサッカライドは、結合するペプチドが複合体から極めて容易に解離するというさらなる利点を有する。単に複合体を水又は血清に20℃、24時間浸漬するだけで、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも40%のペプチド生物学的活性（結合前のペプチドの活性に基づく）を水性溶液に解離させることができる。

【0031】

典型的には、例えば治療ペプチドとポリサッカライドを溶媒と共に分散させ次に溶媒を除いて、分子レベルで治療ペプチドとポリサッカライドを密接に混合させて複合体を製造する。

【0032】

好ましくは、治療ペプチドとポリサッカライドの複合体は、製薬的に許容可能な担体に分散した固体又はコロイド状粒子の形態である。好ましくは、粒子の直径は、50μmより小さく、より好ましくは10μmより小さく、最も好ましくは2μmより小さい。製薬的に許容可能な担体は固体面又は固体マトリックスでもよい。しかし、好ましくは、担体は、その中で治療ペプチドとポリサッカライドが分散する水性液体又はゲルである。特定の好ましい実施形態では、本発明による滅菌組成物は、好ましくは粘度が20℃で少なくとも100Ns/mである粘性液体又はゲルであり、ヒト又は動物の体、特に傷に局所投与するのに適する。

【0033】

他の好ましい実施形態では、本発明による滅菌組成物は治療ペプチドとポリサッカライドを含む液体（例えば、緩衝塩水）であり、ヒト又は動物の体に静脈内投与するのに適する。

【0034】

他の好ましい実施形態では、本発明の滅菌組成物は、治療ペプチドとポリサッカライドがその面にコートされている固体製薬的担体を含む。好ましくは、固体担体は織布又は不織布、ポリマーフィルム又はウェブであり、傷面へ適用するのに適する。特に好ましい固体担体は生物学的吸収性固体担体、特に織O R C布又は不織O R C布である。これらの実施形態は、例えば、治療ペプチドをポリサッカライドの固体担体（又はポリサッカライドでコートした固体担体）の上にコートし、乾燥して固体担体の面にペプチド／ポリサッカライド複合体を形成して、その後滅菌して製造する。

【0035】

好ましくは、本発明による滅菌組成物を滅菌パッケージする。即ち、好ましくは、これらを滅菌した微生物不透過性容器にパッケージする。

【0036】

第二の側面では、本発明は以下の工程を含む滅菌治療組成物の製造方法を提供する、即ち、治療ペプチドとポリサッカライドの複合体を準備し、この複合体を滅菌し、製薬的に許容可能な担体の中又は上に複合体を分散させる工程を含む。ここで、ポリサッカライドは、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択される。

【0037】

好ましい治療ペプチド、ポリサッカライド及び製薬的に許容可能な担体は、本発明の第一の側面として前記のように定義した通りである。

【0038】

好ましくは、この複合体は、治療ペプチドとポリサッカライドを溶媒に分散させて、次に溶媒を除去して複合体を残留させることにより製造する。好ましくは、溶媒は水性溶媒であり、より好ましくは本質的に水からなる。好ましくは、溶媒は凍結乾燥又は溶媒乾燥により除去する。この結果、一般に、高度に孔の開いたポリサッカライドスponジであってそこに治療ペプチドが接しているものが得られる。次に、この物質を粉碎した後、製薬的に許容可能な担体に分散させる。

【0039】

他の好ましい方法では、ポリサッカライドは、織布又は不織布、ポリマーフィルム、ウェブ又はスポンジの形態であり、好ましくはポリサッカライドを治療ペプチドの溶液に少し浸して、治療ペプチドでコートする。次に、溶媒を蒸留して除くと、その面に治療ペプチド複合体を含むポリサッカライド担体が残る。

【0040】

好ましくは、複合体の滅菌工程は、好ましくは10重量%より少ない水を含む、より好ましくは4%より少ない水を含む、最も好ましくは実質的に無水の治療ペプチド／ポリサッカライド複合体において実施する。オートクレーブやエチレンオキシドによる処理等任意の従来方法により滅菌できる。好ましくは、ガスプラズマによる処理、例えばSTERAD（登録商標）機械で滅菌する。好ましくは、紫外光、電子ビーム又はガンマ線等の電離放射線で滅菌する。より好ましくは、電離放射線はガンマ線であり、最も好ましくは、滅菌用量が少なくとも1kGy乃至50kGy（好ましくは、20kGy乃至30kGy）のコバルト60照射である。即ち、約1mRad乃至3mRadのガンマ線が好ましい。驚くべきことに、ペプチドはガンマ線照射により分解されやすいことが良く知られているにもかかわらず、選択されたポリサッカライドと複合している治療ペプチドを照射しても、治療ペプチドの活性は実質的に損なわれない。どのような理論にも結びつけることは望まないが、ポリサッカライドと複合した治療ペプチドの驚くべき安定性は、ポリサッカライドが照射により生じたフリーラジカルの捕獲剤（trap）として作用することによる可能性がある。

【0041】

本発明に使用する生物学的に活性なペプチドとポリサッカライドの複合体は、さらに、フリーラジカル捕集剤（scavenger）を含んでもよい。使用するのに好適な捕集剤には、トコフェロール、クエン酸、ブチル化ヒドロキシアンソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、*t*ブチルヒドロキノン、没食子酸プロピル、アスコルビン酸誘導体等の抗酸化剤及び食品や医薬品に使用するのに安全であると一般に認められている他の抗酸化剤がある。好ましくは、複合体は、約0.01重量%乃至10重量%、より好ましくは0.1重量%乃至5重量%のフリーラジカル捕集剤を含む。

【0042】

好ましくは、分散工程は滅菌工程の後で無菌条件下で実施する。治療ペプチドとポリサッカライドの乾燥複合体を滅菌して、次にこの滅菌した複合体を無菌条件下で液体、ゲル又は半固体担体に分散させて、滅菌治療組成物を製造することが特に有用である。

【0043】

第三の側面では、本発明は以下の工程を含む滅菌治療ペプチドの製造方法を提供する、即ち、治療ペプチドを準備し、治療ペプチドとポリサッカライドの複合体を形成し、この複合体を滅菌し、次に無菌条件下で複合体から治療ペプチドを分離して滅菌治療ペプチドを得る工程を含む。ここで、ポリサッカライドはセルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択される。

【0044】

本発明のこの側面も、前述のように、標準滅菌条件下で治療ペプチドを分解しないように安定化するために、ポリサッカライドの注目すべき能力を利用する。好ましい治療ペプチド、ポリサッカライド及び滅菌方法は、本発明の第一の側面及び第二の側面として、上述した通りである。

【0045】

好ましくは、単に抽出溶媒（好ましくは、水性溶媒）だけで滅菌複合体から治療ペプチドを分離する。例えば、可溶性治療ペプチドと非水溶性ポリサッカライドを含む複合体では、この複合体を単に水に分散又は懸濁して、ろ過又は精密ろ過することにより溶解した治療ペプチドをポリサッカライドから分離できる。O R Cとキトサンは、水溶液中で結合ペプチドを容易に放出すると考えられるので特に好ましい。クロマトグラフィ等の他の従来の無菌分離方法ももちろん使用できる。滅菌治療ペプチドをクロマトグラフィ等によりさらに精製し、凍結乾燥で濃縮してもよい。好ましくは、滅菌治療ペプチドは実質的に純粋である。

【0046】

要約すると、本発明は、治療ペプチドと選択されたポリサッカライドの間で複合体を形成することにより、標準滅菌条件下で、治療ペプチドが分解されないよ

うに安定化する。好ましくは、複合体は無水、例えば凍結乾燥複合体である。得られた滅菌複合体は、従来の局所又は非経口投与用治療製品に製剤できる。

【0047】

従って、本発明は、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択されるポリサッカライドの、生物学的活性の消失が少ない治療ペプチドの電離放射線による滅菌に使用する、治療ペプチドとの複合体を形成するための用途を提供する。ペプチドの最初の生物学的活性のうち、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも40%が滅菌複合体から回復できる。

【0048】

また、本発明は、ペプチドと、セルロース誘導体、キチン、キトサン、ガラクトマンナン及びこれらの混合物からなる群から選択されるポリサッカライドの間で複合体を形成し、電離放射線を用いてこの複合体を滅菌することを含む、生物学的活性の消失が少ない生物学的に活性なペプチドの滅菌方法を提供する。

【0049】

以下、図面を参照して本発明の実施形態を説明する。

【0050】

【実施例】

例1 (比較のため)

以下の様に、血小板由来成長因子 (PDGF) と複合させた繊維状コラーゲンの固体スponジを製造して滅菌した。

【0051】

牛真皮から採取した酸膨潤天然コラーゲン繊維の水性スラリーを、U S - A - 4 6 1 4 7 9 4 又は U S - A - 4 3 2 0 2 0 1 に記載されているように製造した (これらの文献の内容の全てをここに援用する)。スラリーの固体含有量は1重量%であった。スラリーを0.05M酢酸で酸性にしてコラーゲン繊維を膨潤した。次に、PDGF (シグマ・ケミカル・コーポレーション) を、コラーゲンの重量に基づき、0重量% (対照)、0.1重量%、0.33重量%及び1重量%の濃度で、スラリーサンプルに加えた。スラリーを脱気した。各スラリーサンプ

ル30gを100cm²ペトリ皿に注ぎ、急速冷凍し、その後一晩凍結乾燥した

【0052】

得られたコラーゲンスponジを半分に切り、各スponジの1方の半分を2.5
kGyの⁶⁰Coガンマ線照射で滅菌した。各スponジの他方の半分は対照として
滅菌しなかった。

【0053】

これらのサンプルを、PDGFの溶離と生物学的活性について、後述する方法
1に従ってテストした。

【0054】

典型的な結果を図2に示す。コラーゲンのみと複合したPDGFの活性は滅菌
しても実質的に変化しないことが分かる。

【0055】

精製した凍結乾燥PDGFについて比較テストを実施した。図1に示す結果に
よれば、精製PDGF成長因子を滅菌するとPDGF活性が大幅に減少した。

【0056】

PDGFを加えない、別のコラーゲン対照サンプルでは、滅菌前後に活性は無
かった。

【0057】

例2

例1と同様にして、PDGFと複合させた纖維状コラーゲン/ORCの固体ス
ponジを製造した。ただし、PDGFを加える前に、80重量%（コラーゲンの
重量に基づく）の粉碎SURGICEL（登録商標）ORC纖維をコラーゲンスラリーに
加えた。得られた生成物は、コラーゲンとORCを合わせた重量に基づき0（比
較）、0.1重量%、0.33重量%及び1.0重量%のPDGFを含むコラ
ゲン/ORCスponジであった。

【0058】

これらのサンプルを、PDGFの溶離と生物学的活性について、後述する方法
1に従ってテストした。

【0059】

典型的な結果を図2に示す。コラーゲン/ORCだけと複合したPDGFの活性は滅菌しても実質的に変化しないことが分かる。驚くべきことに、生物学的に活性なPDGFの滅菌複合体からの溶離は、非滅菌複合体からの溶離よりも良好である。

【0060】

例3

以下の様にして、PDGFでコートしたORCの固体マトリックスを製造した。

。

【0061】

SURGICEL(登録商標)ORC布(2 cm^2)をPDGFの1%水溶液に少し浸し、室温で乾燥し、半分に切った。一方の半分を例1と同様にガンマ線照射により滅菌し、他方の半分を比較のためにとっておいた。

【0062】

これらのサンプルを、PDGFの溶離と生物学的活性について、後述する方法1に従ってテストした。

【0063】

典型的な結果を図2に示す。ORCのみと複合したPDGFの生物学的活性は滅菌しても実質的に変化しないことが分かる。さらに、滅菌の前と後の両方において、PDGFは、コラーゲン複合体よりもORC複合体からの方がより容易に溶離する。

【0064】

例4

例2と同様にして、アプロチニンと複合させたコラーゲン/ORCの固体スポンジを製造した。ただし、PDGFは加えずに、牛肺アプロチニン(シグマ・ケミカル・コーポレーション)を、コラーゲンとORCを合わせた重量に基づき0重量% (対照) 及び10重量%の量で加えた。

【0065】

これらの複合体を、アプロチニンの結合と活性について、方法2に従ってテス

トした。テスト結果は、アプロチニンがコラーゲン/ORCと複合しているときは、ガンマ線照射の後でも、大部分のアプロチニンが保存されていたことを示した。

【0066】

驚くべきことに、この結果は、さらに、非照射コラーゲン/ORCマトリックスよりも照射コラーゲン/ORCマトリックスからの方が、アプロチニンがより速く解離したことを見た。

【0067】

例5

以下の様にして、キトサンの、ペプチドと可逆的に結合する能力及び滅菌時に生物学的活性が消失しないようにペプチドを安定化させる能力について実験した。

【0068】

例1および例2と同様にして、PDGFと複合させたキトサン及び55/45コラーゲン/キトサンの固体スponジを製造した。ただし、例1のコラーゲンをキトサンに代え、例2のORCを複合体の重量に基づき45重量%の量のキトサンに代えた。

【0069】

これらの複合体サンプルを、例1と同様にしてガンマ線照射により滅菌した。

【0070】

これらのサンプルについて方法1を実施し、時間を関数として、血清溶液でサンプルから抽出した生物学的に活性なPDGFの量を評価した。滅菌サンプルと非滅菌サンプルの両方についてデータを集めた。

【0071】

図3に示す結果によると、滅菌の前と後の両方で、元のPDGFの大部分が複合体から解離することが分かる。PDGFは、コラーゲン/キトサン複合体よりもキトサンからの方が少しだけ容易に解離する。PDGFの生物学的活性は、キトサン又はコラーゲン/キトサンの存在下では、滅菌により影響を受けない。

【0072】

例6 (比較のため)

例5と同様にして、ヒアルロン酸ナトリウムの、ペプチドと可逆的に結合する能力及び滅菌時に生物学的活性が消失しないようにペプチドを安定化させる能力について実験した。ただし、例5のキトサンをヒアルロン酸ナトリウムに代えた。

【0073】

方法1による結果を図4に示す。滅菌の前と後の両方において、PDGFが複合体から容易に解離することが分かる。しかし、ヒアルロン酸ナトリウムの存在下では、滅菌した後、抽出したPDGFの生物学的活性は顕著に減少する。例1に記載したようにコラーゲンはPDGFに安定化効果を及ぼすので、コラーゲン/ヒアルロン酸ナトリウム複合体についての生物学的活性の減少はそれほどでもない。ヒアルロン酸ナトリウムは滅菌時に生物学的活性が消失しないようにPDGFを安定化しないことが結論付けられる。

【0074】

例7 (比較のため)

例5と同様にして、ペクチンの、ペプチドと可逆的に結合する能力及び滅菌時に生物学的活性が消失しないようにペプチドを安定化させる能力について実験した。ただし、例5のキトサンをペクチンに代えた。

【0075】

方法1による結果を図5に示す。滅菌の前と後の両方において、PDGFが複合体から容易に解離することが分かる。しかし、ペクチンの存在下では、滅菌した後、抽出したPDGFの生物学的活性は顕著に減少する。例1に記載したようにコラーゲンはPDGFに安定化効果を及ぼすので、コラーゲン/ペクチン複合体についての生物学的活性の減少はそれほどでもない。ペクチンは滅菌時に生物学的活性が消失しないようにPDGFを安定化しないことが結論付けられる。

【0076】

例8

例5と同様にして、イナゴマメゴムの、ペプチドと可逆的に結合する能力及び滅菌時に生物学的活性が消失しないようにペプチドを安定化させる能力について

実験した。ただし、例5のキトサンをイナゴマメゴムに代えた。

【0077】

方法1による結果を図6に示す。滅菌の前と後のいずれにおいても、P D G Fの生物学的活性はほとんど複合体から解離しないことがわかる。しかしイナゴマメゴムの存在下では、滅菌した後、抽出したP D G Fの生物学的活性はほとんど減少しない。さらに、イナゴマメゴムが、複合体に存在するコラーゲンによる効果以上の安定化効果を付与することが分かる。イナゴマメゴムは滅菌時に生物学的活性が消失しないようにP D G Fを安定化することが結論付けられる。

【0078】

例9 (比較のため)

例5と同様にして、ベータグルカンの、ペプチドと可逆的に結合する能力及び滅菌時に生物学的活性が消失しないようにペプチドを安定化させる能力について実験した。ただし、例5のキトサンをベータグルカンに代えた。

【0079】

方法1による結果を図7に示す。滅菌の前と後の両方において、P D G Fが複合体からほとんど解離しないことが分かる。さらに、ベータグルカンの存在下では、滅菌した後、抽出したP D G Fの生物学的活性は顕著に減少する。ベータグルカンは滅菌時に生物学的活性が消失しないようにP D G Fを安定化しないことが結論付けられる。

【0080】

例10 (比較のため)

例5と同様にして、アルギン酸ナトリウムの、ペプチドと可逆的に結合する能力及び滅菌時に生物学的活性が消失しないようにペプチドを安定化させる能力について実験した。ただし、例5のキトサンをアルギン酸ナトリウムに代えた。

【0081】

方法1による結果を図8に示す。滅菌の前と後の両方において、P D G Fは複合体と強く結合していることが分かる。この結合が強いので、アルギン酸ナトリウムが滅菌時に生物学的活性が消失しないようにP D G Fを安定化しているのか否かは、解離したP D G Fから明らかにならない。アルギン酸ナトリウムは滅菌

時に生物学的活性が消失しないように P D G F を安定化させるのに有用ではない
ようだと結論付けられる。

【0082】

例11

傷の治癒を促す局所投与用滅菌医薬ゲルを以下の様に製剤した（重量%）。

カルボキシメチルセルロース	2.4%
ヒドロキシエチルセルロース	0.3%
塩化ナトリウム	0.24%
プロピレングリコール	20.2%
コラーゲン／O R C／P D G F 1 重量%	2.0%
水	残量

【0083】

コラーゲン／O R C／1 重量% P D G F を例2と同様に製造した。次に、約1
 μ m乃至10 μ mの粒子サイズへ粉碎し、ガンマ線照射で滅菌し、その後、無菌
 条件下で他の成分と混合して、傷の治癒を促進させるために傷に適用するのに適
 した滅菌水性ゲルを得た。

【0084】

例12

滅菌した、実質的に純粹な P D G F を以下の様に製造した。

【0085】

例1で製造した1% P D G F／コラーゲンスponジを10 μ mより小さい粒子
 サイズまで粉碎し、次にガンマ線照射で滅菌した。この滅菌複合体を滅菌塩水（
 pH 8）を用いて1時間35°Cで処理して、滅菌P D G Fを抽出し、統いて無菌
 条件下でろ過と凍結乾燥して、滅菌P D G Fを得た。

【0086】

方法1

P D G F の活性に及ぼす複合化と滅菌の効果を以下の様に評価した。

【0087】

パンチ生検サンプル（直径6mm）を1mlのダルベッコ変性イーグル培地（

D MEM) に設置して、温環境細胞培養インキュベーターで 37°C 5% CO₂ で培養して、各サンプルの 24 時間リリーサイトを製造した。各サンプルの溶離を 2 回テストした。

【0088】

P D G F の生物学的活性は、メチレンブルー・アッセイを用いて細胞の数を測定して増殖により評価した。即ち、A H D F (ヒト大人皮膚織維芽細胞) を 95% コンフルーエンシイまで成長させ、トリプシン処理し、カウントし、10% F B S / D M E M で 3×10^4 細胞 / m l の細胞密度で 96 穴マイクロタイタープレート (100 μl / 穴 - 3000 細胞 / 穴) で再び培養した。細胞を、この培地で、温環境細胞培養インキュベーターで 37°C 5% CO₂ で一晩付着、拡散させた。次に、培地を除き、細胞単層を P B S で洗い、テストサンプル又は標準サンプルを 100 μl / 穴に加えた。各テストサンプルを × 8 テストし、シリジフィルター (0.2 μm) でろ過して滅菌した。各サンプルは、取り込んだ P D G F の見積もり濃度に応じて希釈した。これは、線状範囲にわたって P D G F を定量できるようにするために必要であった。ヒト組換 P D G F - B B を標準サンプルとして使用し、S F - D M E M で希釈し、500 ng / m l 乃至 1 ng / m l の濃度範囲で用いた。刺激剤を細胞と共にさらに 3 日間 37°C、5% CO₂ で培養し、その後、培地を除いて細胞単層を FORMOL (登録商標) 塩水で固定した。次に、細胞をメチレンブルーで染色し、過剰染色を除いて、酸性エタノールを用いて細胞単層から色素を溶離した。溶解した色素を、マイクロタイタープレート分光光度計を用いて、630 nm で定量し、BIOLINX (登録商標) ソフトウェアを用いてデータを分析した。

【0089】

各サンプルから解離した P D G F のトータルレベルを E L I S A を用いて測定した。P D G F - B B に対するモノクローナル獲得抗体を、0.5 μg / m l、0.025 M - N a H C O₃、0.025 M - N a₂ C O₃、0.025 M - N a₂ C O₃、p H 9.7 (100 μl / 穴) で用いて、4°C で一晩培養した。残った結合部位を 3% B S A / P B S で 1 時間 37°C でブロックした後、テストサンプル及び標準サンプルを加えた。各サンプルを 3 回テストし、標準曲線は 50

0 ng/ml から 1 ng/ml の範囲であった。濃度を正確に見積るために、各サンプルを異なる希釈液でテストした。PDGF (1/1000 希釈) に対する第一のポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼ接合体 (1/5000 希釈) と共に第二の抗ウサギ IgG を用いて、テストサンプル中の PDGF レベルを定量した。次に、始めは青色だが 1 M 硫酸を加えると黄色に変わる可溶性基質 TM B を用いて、ペルオキシダーゼのレベルを定量した。色は 450 nm で分光光度計でモニターした。

【0090】

方法2

アプロニチンの活性に及ぼす複合化と滅菌の効果を以下の様に評価した。

【0091】

3 mm パンチ生検サンプルを、コラーゲン/ORC、アプロニチン含有コラーゲン/ORC (照射済) 及びアプロニチン含有コラーゲン/ORC から、2つづつ取った。各スポンジから取った 2 つのパンチ生検サンプルを、滅菌プラスチック容器内で 1 ml の DMEM に加えた。37 °C 培養における 0 時間から 48 時間にわたる多数の時点の後、DMEM を除いた。これらのリリーセイト (溶離液) は、アプロニチン活性の作用アッセイまで、20 °C で保存した。

【0092】

アプロニチンの作用活性に及ぼす照射の効果は、アプロニチンが精製プラスミンサンプルを阻害する能力を測定することにより、テストした。40 μl のプラスミン (40 ng)、10 μM のプラスミン蛍光基質及び 0.5% TRITON (登録商標) 含有トリス HCl 緩衝液 (pH 8.1) を含む総容量が 100 μl のアッセイ溶液に、10 μl のリリーセイトを加えた。ポジティブ対照はリリーセイト無しでアッセイした。

【0093】

さらに、0.5 ng/ml 乃至 1 ng/ml のアプロチニンの様々な濃度についてプラスミン阻害の標準曲線を作成し、計算の基礎として使用した。

【0094】

アッセイは 37 °C で 1 時間モニターして、蛍光生成プレートリーダーを用いて

蛍光量を検出した（455 nmで放出、383 nmで励起）。

【0095】

上記の実施例は説明の目的だけで示されたものである。当業者には、特許請求の範囲内にある他の多くの本発明の実施形態が明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ガンマ線照射による滅菌の前と後における凍結乾燥P D G F（比較例）の活性を示すグラフ図である。

【図2】

ガンマ線照射による滅菌の前（非影線）と後（影線）における、（i）コラーゲンのみ、（ii）O R Cのみ及び（iii）コラーゲン／O R C複合体と複合したP D G Fの活性を示すグラフ図である。

【図3】

（i）ガンマ線照射しないキトサンと複合したP D G F、（ii）コラーゲン／キトサン55：45混合物と複合したP D G F、（iii）ガンマ線照射滅菌したキトサンと複合したP D G F、及び（iv）ガンマ線照射滅菌したコラーゲン／キトサン55：45混合物と複合したP D G Fの複合体について、抽出時間に対して、測定した溶液中のP D G F活性を示すグラフ図である。

【図4】

（i）ガンマ線照射しないヒアルロン酸ナトリウム（N a H A）と複合したP D G F、（ii）コラーゲン／N a H A 55：45混合物と複合したP D G F、（iii）ガンマ線照射滅菌したN a H Aと複合したP D G F、及び（iv）ガンマ線照射滅菌したコラーゲン／N a H A 55：45混合物と複合したP D G Fの複合体について、抽出時間に対して、測定した溶液中のP D G F活性を示すグラフ図である。

【図5】

（i）ガンマ線照射しないペクチンと複合したP D G F、（ii）コラーゲン／ペクチン55：45混合物と複合したP D G F、（iii）ガンマ線照射滅菌したペクチンと複合したP D G F、及び（iv）ガンマ線照射滅菌したコラーゲ

ン/ペクチン55:45混合物と複合したPDGFの複合体について、抽出時間に対して、測定した溶液中のPDGF活性を示すグラフ図である。

【図6】

(i) ガンマ線照射しないイナゴマメゴムと複合したPDGF、(ii) コラーゲン/イナゴマメゴム55:45混合物と複合したPDGF、(iii) ガンマ線照射滅菌したイナゴマメゴムと複合したPDGF、及び(iv) ガンマ線照射滅菌したコラーゲン/イナゴマメゴム55:45混合物と複合したPDGFの複合体について、抽出時間に対して、測定した溶液中のPDGF活性を示すグラフ図である。

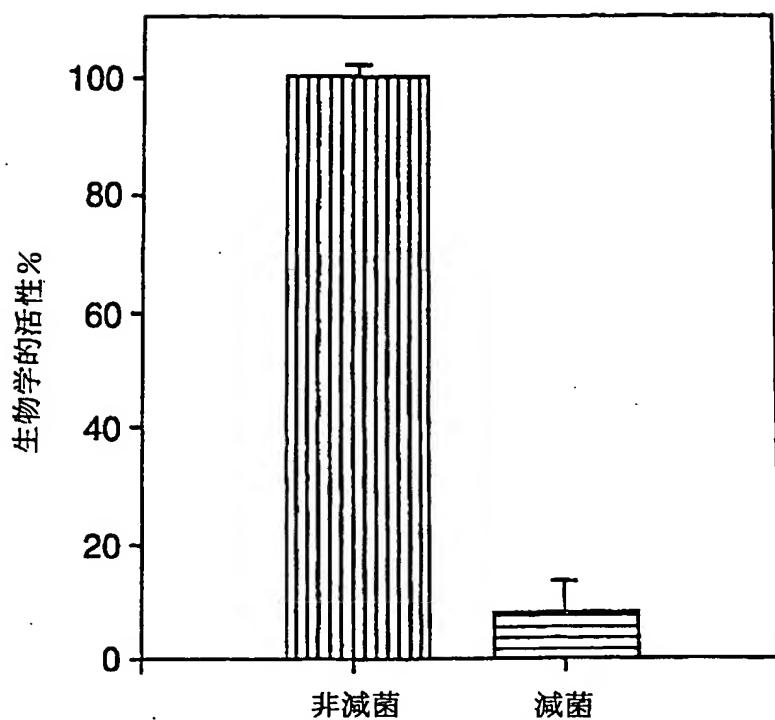
【図7】

(i) ガンマ線照射しないベータグルカンと複合したPDGF、(ii) コラーゲン/ベータグルカン55:45混合物と複合したPDGF、(iii) ガンマ線照射滅菌したベータグルカンと複合したPDGF、及び(iv) ガンマ線照射滅菌したコラーゲン/ベータグルカン55:45混合物と複合したPDGFの複合体について、抽出時間に対して、測定した溶液中のPDGF活性を示すグラフ図である。

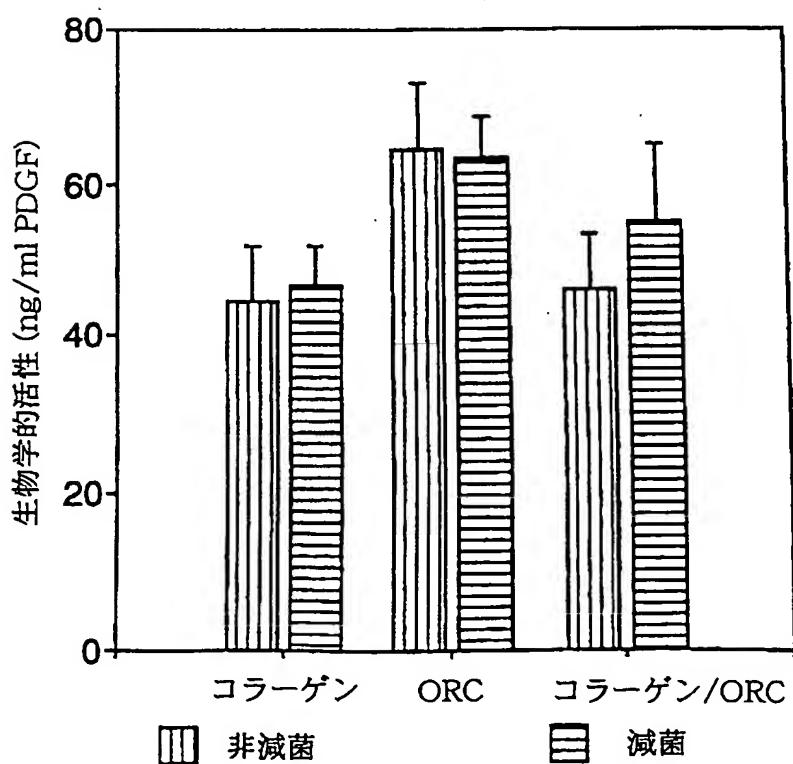
【図8】

(i) ガンマ線照射しないアルギネートと複合したPDGF、(ii) コラーゲン/アルギネート55:45混合物と複合したPDGF、(iii) ガンマ線照射滅菌したアルギネートと複合したPDGF、及び(iv) ガンマ線照射滅菌したコラーゲン/アルギネート55:45混合物と複合したPDGFの複合体について、抽出時間に対して、測定した溶液中のPDGF活性を示すグラフ図である。

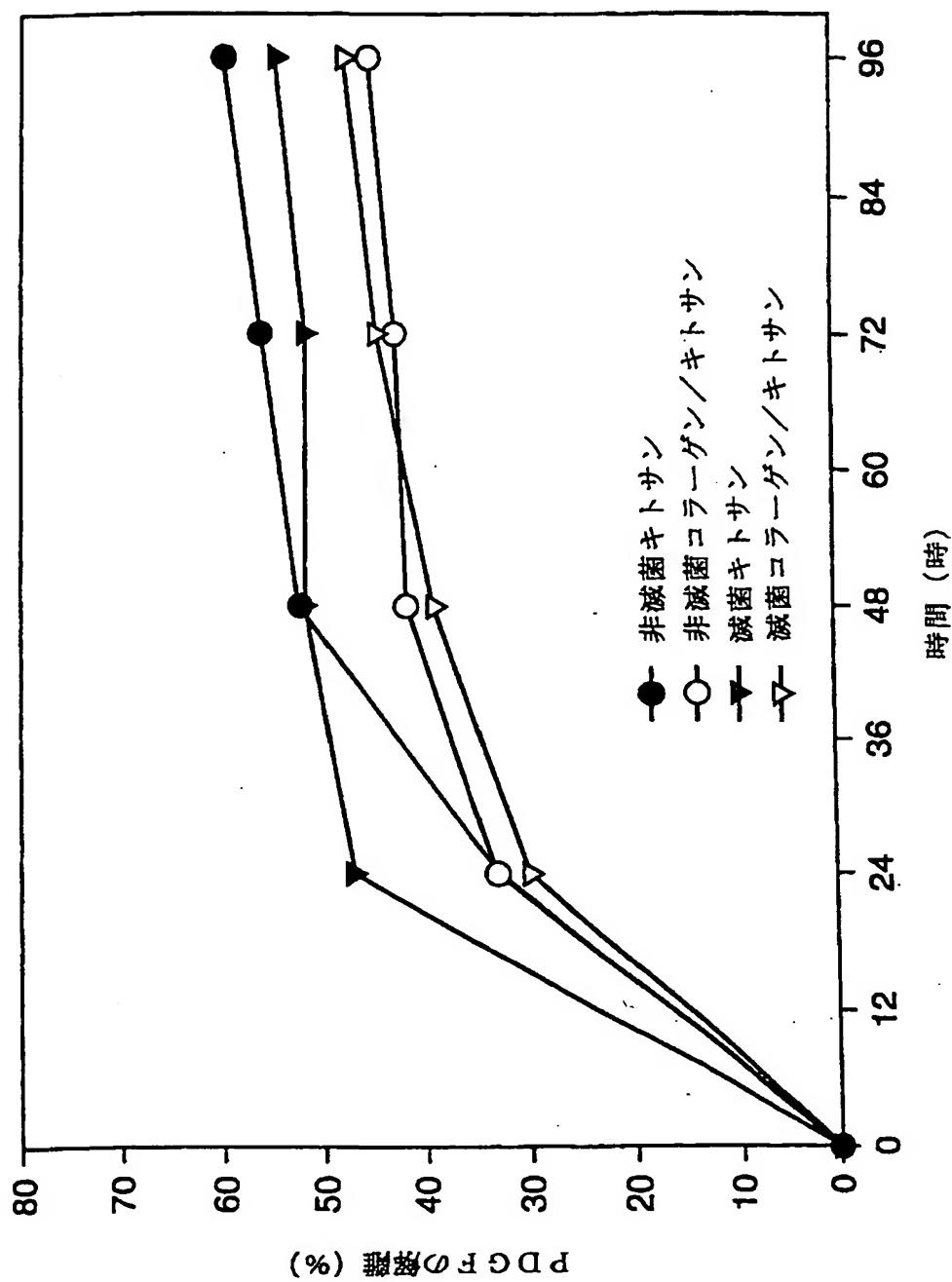
【図1】



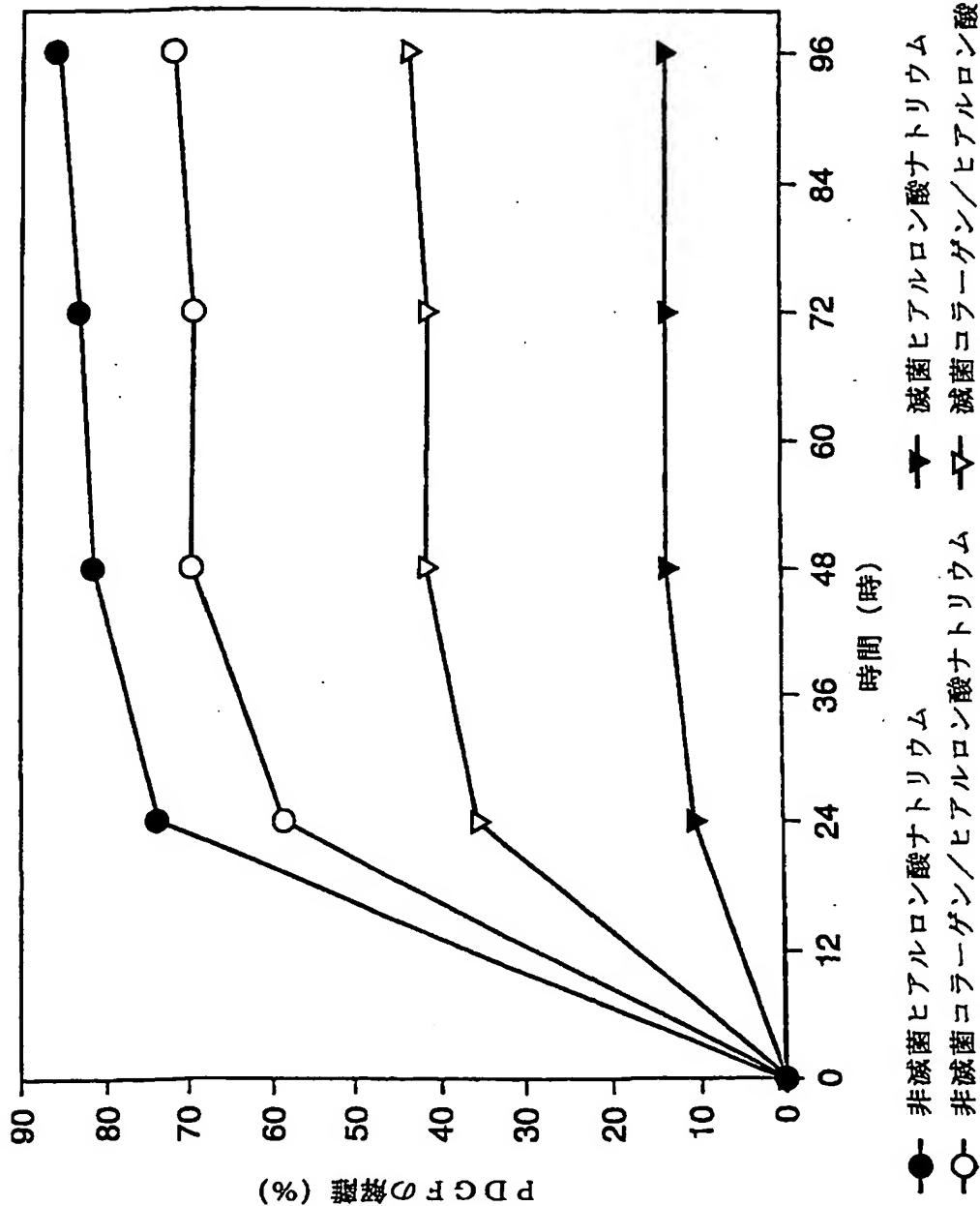
【図2】



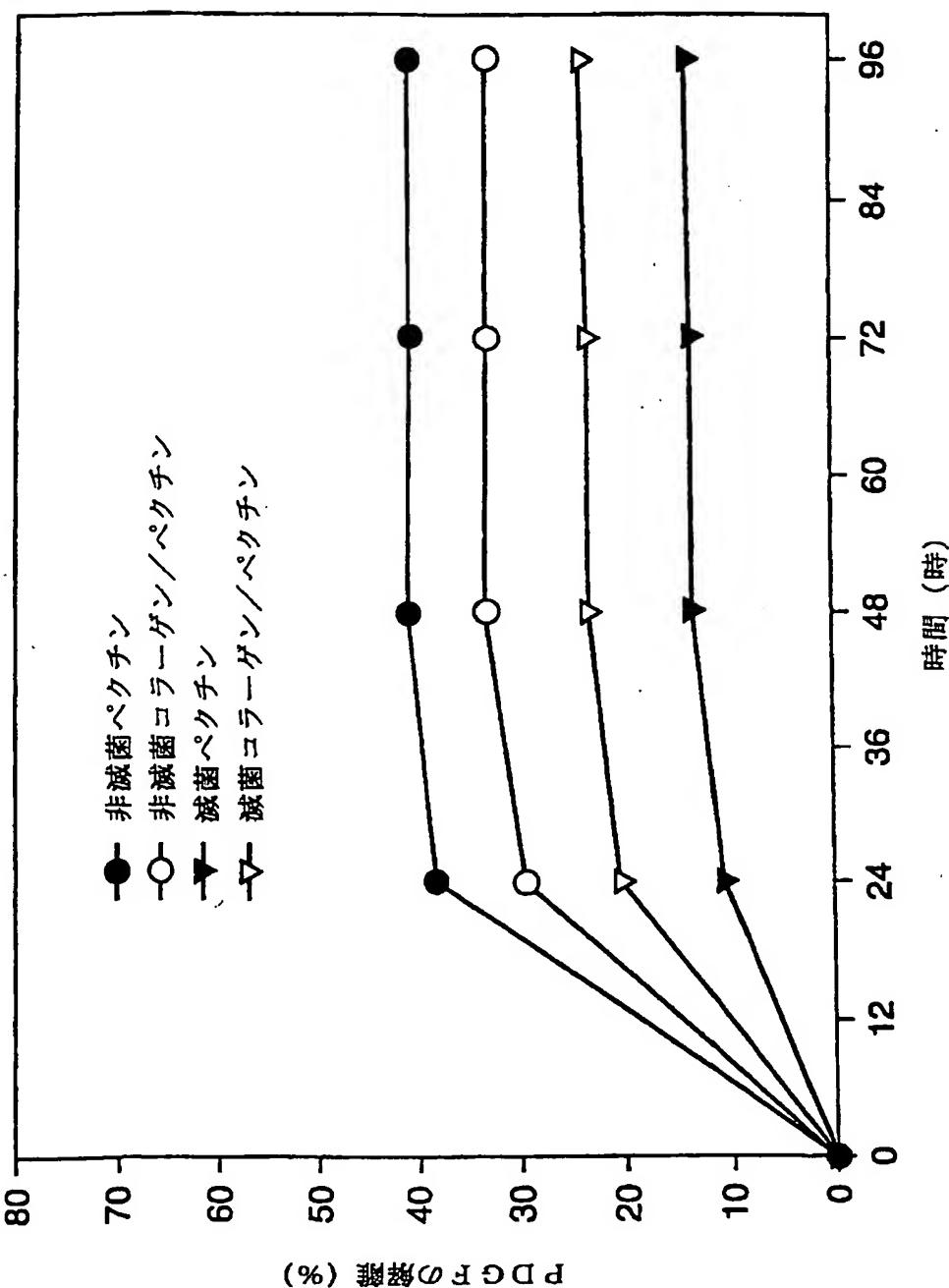
【図3】



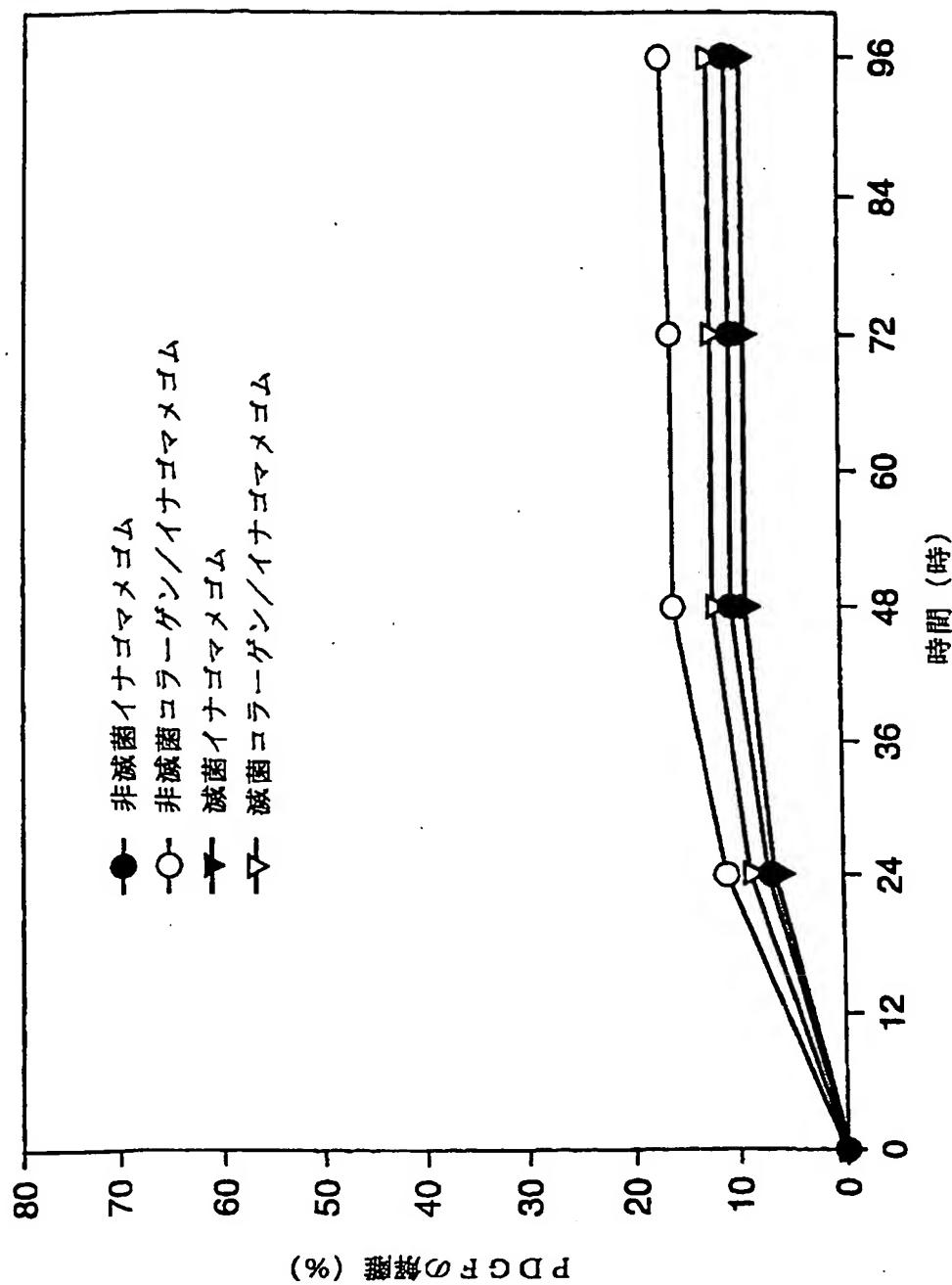
【図4】



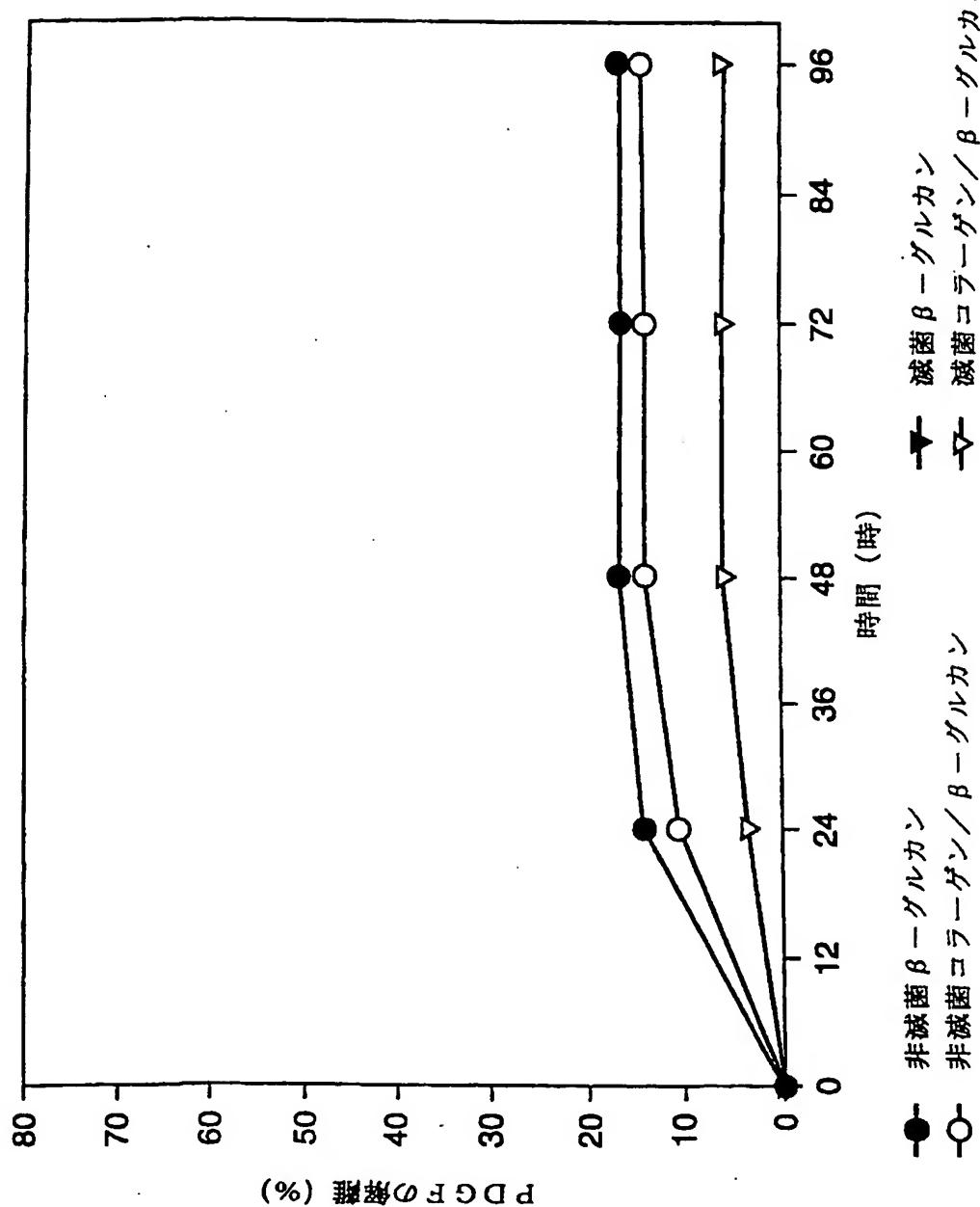
【図5】



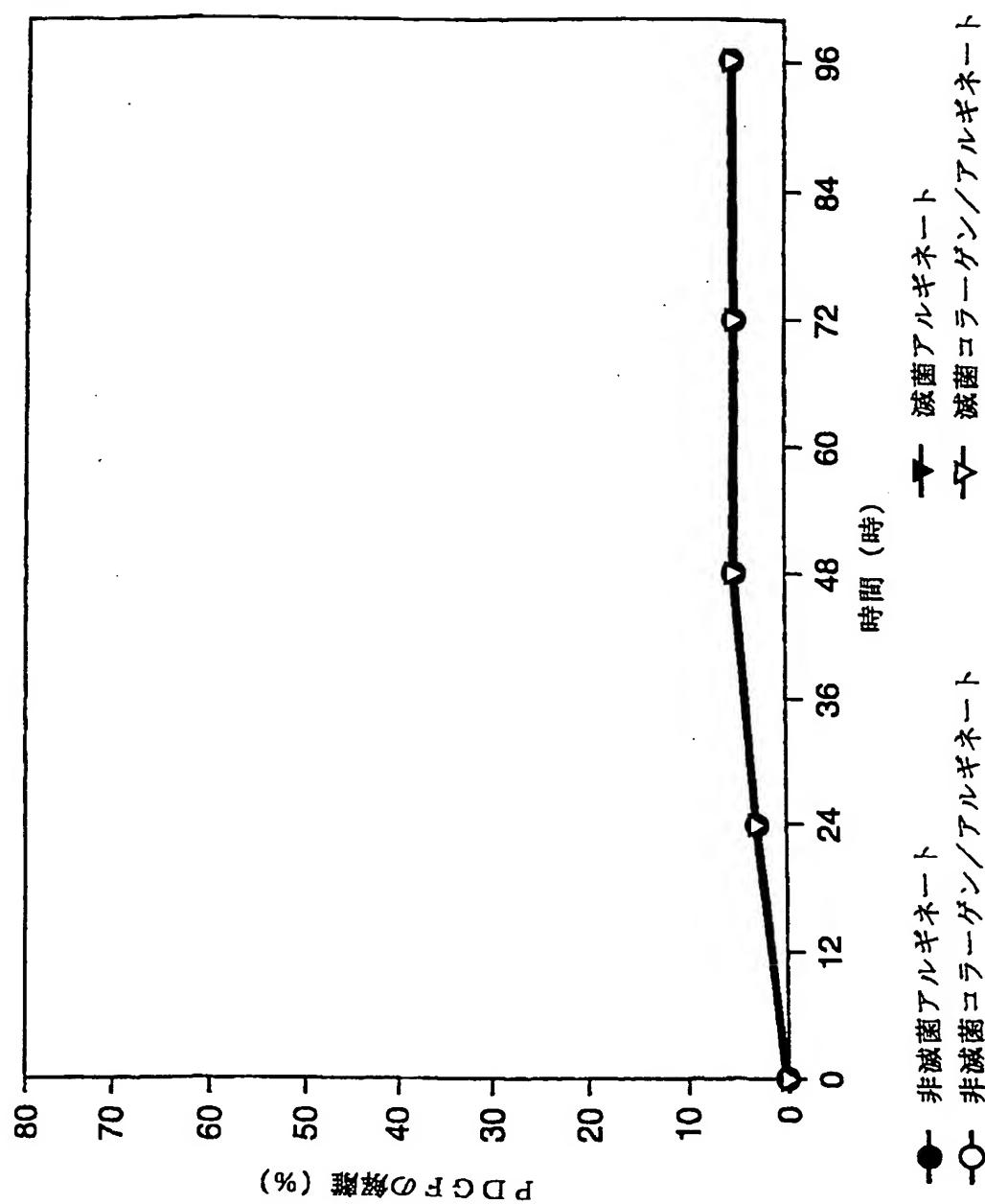
【図6】



【図7】



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l and Application No PCT/GB 99/04094
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61L15/28 A61L15/32 A61L15/44 A61L15/22 A61L31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPO B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61L C08B C07G C08L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2 314 842 A (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL) 14 January 1998 (1998-01-14) abstract page 1, line 3-6 page 3, line 18-37 page 5, line 15-22 page 6, line 6-29 page 6, line 13-15 claims 14,23,26; example 4	1-6, 8-10,14, 16, 18-28, 30-32 -/-/
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document not published on or after the International filing date "C" document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document member of the same patent family		
Date of the actual compilation of the International search	Date of mailing of the International search report	
7 March 2000	14/03/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 8018 Patentdienst 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-3040, Fax 91 651 800 rt, Fax (+31-70) 940-3076	Authorized officer Böhml, I	

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Item
and Application No.
PCT/GB 99/04094

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2 257 909 A (DEBIO RECH PHARMA SA) 27 January 1993 (1993-01-27) page 1, paragraph 1 page 2, paragraph 2 page 8, paragraph 4 -page 9, paragraph 1 example 7 claims 1,2,4	1-6, 8-10,14, 16, 18-28, 30-32
A	GB 2 314 840 A (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL) 14 January 1998 (1998-01-14) abstract page 3 -page 4 claims 17-19	1-6,8,9, 14,16, 23-26,32
A	EP 0 267 015 A (ETHICON INC) 11 May 1988 (1988-05-11) cited in the application abstract page 2, line 3-48 page 3, line 22-35 page 4, line 1-24 page 5, line 2-7,48-54 claim 8	1-5,8, 16,23
A	CA 2 094 658 A (ALLELIX BIOPHARMA) 24 October 1993 (1993-10-24) page 1, line 5-9 page 2, line 9-27 page 4, line 4-10	1,2,5, 16-20
A	EP 0 312 208 A (ETHICON INC) 19 April 1989 (1989-04-19) cited in the application abstract page 2, line 4-31,51-54 page 3, line 36-43 page 4, line 23-43 page 6, line 1-16	1-5, 16-19,23
A	EP 0 238 839 A (ROEM PHARMA GMBH) 30 September 1987 (1987-09-30) cited in the application abstract page 2, line 1-3,34-40; claims 1-6	1,2,5, 16-20
A	WO 95 18635 A (PHARMACIA AB ;JEDERSTROEM GUSTAV (SE)) 13 July 1995 (1995-07-13) the whole document	1,5,8
		-/-

Form PCT/RRM/216 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Date	Initial Application No.
PCT/GB 99/04094	

C. (Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 04019 A (UNIV CALIFORNIA) 4 April 1991 (1991-04-04) page 2, line 13-31 page 5, line 7-13 page 6, line 17-30	1,2,4, 18,20

Form PCT/ISA/2210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Title and Application No
PCT/GB 99/04094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 2314842	A 14-01-1998	AU	3269297 A	21-01-1998
		CA	2258990 A	08-01-1998
		CZ	9804251 A	12-05-1999
		EP	0918548 A	02-06-1999
		WO	9800180 A	08-01-1998
		PL	330824 A	07-06-1999
GB 2257909	A 27-01-1993	CH	683149 A	31-01-1994
		AT	403348 B	26-01-1998
		AT	148992 A	15-06-1997
		AU	651711 B	28-07-1994
		AU	2043692 A	28-01-1993
		AU	652844 B	08-09-1994
		AU	2043792 A	28-01-1993
		BE	1005696 A	21-12-1993
		BE	1005697 A	21-12-1993
		BR	9205375 A	08-03-1994
		CA	2074320 A, C	23-01-1993
		CA	2074322 A	23-01-1993
		CH	683592 A	15-04-1994
		WO	9301802 A	04-02-1993
		CN	1070344 A	31-03-1993
		CZ	9300660 A	19-01-1994
		DE	4223282 A	28-01-1993
		DE	4223284 A	28-01-1993
		DE	9219084 U	25-09-1997
		DK	93892 A	23-01-1993
		DK	93992 A	23-01-1993
		ES	2037621 B	01-02-1994
		ES	2050070 A	01-05-1994
		FI	923320 A	23-01-1993
		FI	923321 A	23-01-1993
		FR	2679450 A	29-01-1993
		FR	2680109 A	12-02-1993
		GB	2257973 A, B	27-01-1993
		GR	1001446 B	30-12-1993
		GR	92100323 A, B	24-05-1993
		HR	920229 A	30-04-1996
		HU	64234 A	28-12-1993
		IE	69967 B	16-10-1996
		IE	71199 B	12-02-1997
		IL	102590 A	13-07-1997
		IL	102591 A	10-06-1997
		IT	1259891 B	28-03-1996
		IT	1259892 B	28-03-1996
		JP	6172208 A	21-06-1994
		JP	2842736 B	06-01-1999
		JP	5221855 A	31-08-1993
		LU	88150 A	15-02-1993
		LU	88151 A	15-02-1993
		MX	9204268 A	31-03-1994
		NL	9201309 A	16-02-1993
		NL	9201310 A	16-02-1993
		NO	304136 B	02-11-1998
		NO	304057 B	19-10-1998
		NZ	243643 A	26-10-1993
		PL	298504 A	10-01-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Appl. No.
PCT/GB 99/04094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 2314840 A	14-01-1998	AU 3269397 A CA 2258849 A CZ 9804274 A EP 0907664 A WO 9800446 A PL 330825 A		21-01-1998 08-01-1998 12-05-1999 14-04-1999 08-01-1998 07-06-1999
EP 0267015 A	11-05-1988	US 4717717 A AT 80042 T AU 614941 B AU 8064187 A CA 1322328 A DE 3781509 A DK 579787 A ES 2044952 T GR 871700 A JP 63152324 A JP 2942227 B JP 10167980 A JP 2988925 B JP 11255663 A MX 171861 B NZ 222413 A NZ 235556 A PT 86075 A,B SG 104292 G IN 165249 A ZA 8708283 A		05-01-1988 15-09-1992 19-09-1991 12-05-1988 21-09-1993 08-10-1992 06-05-1988 16-01-1994 04-03-1988 24-06-1988 30-08-1999 23-06-1998 13-12-1999 21-09-1999 22-11-1993 25-06-1991 25-06-1991 01-12-1987 24-12-1992 09-09-1989 28-06-1989
CA 2094558 A	24-10-1993	NONE		
EP 0312208 A	19-04-1989	AU 2223588 A GR 88100617 A,B JP 2000112 A MX 169808 B NZ 226171 A PT 88541 A US 5457093 A US 5705485 A US 5427778 A ZA 8806947 A		23-03-1989 22-06-1989 05-01-1990 27-07-1993 26-06-1990 31-07-1989 10-10-1995 06-01-1998 27-06-1995 30-05-1990
EP 0298839 A	30-09-1987	DE 3606265 A JP 62207464 A US 4904469 A		03-09-1987 11-09-1987 27-02-1990
WO 9518635 A	13-07-1995	AU 689841 B AU 1469295 A CA 2179294 A EP 0750515 A JP 9507244 T		09-04-1998 01-08-1995 13-07-1995 02-01-1997 22-07-1997
WO 9104019 A	04-04-1991	AU 6426890 A		18-04-1991

フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	マークコード(参考)
A 6 1 K	38/22	A 6 1 P	17/00
	38/28		1 0 1
	47/48		31/04
A 6 1 L	15/16	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	7/04	A 6 1 L	15/01
	17/00	A 6 1 K	37/24
	1 0 1		37/26
	31/04		37/12
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K E, L S, M W, S D, S L, S Z, T Z, U G, Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A E, A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C R, C U, C Z, D E, D K, D M, E E, E S, F I, G B, G D, G E, G H, G M, H R, H U, I D, I L, I N, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M A, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, T Z, U A, U G, U S, U Z, V N, Y U, Z A, Z W		
(71)出願人	E r s k i n e H o u s e, 68-73 Q u e e n S t r e e t, E d i n b u r g h E H 2 4 N H, U n i t e d K i n g d o m		
(72)発明者	シルコック・デレク イギリス国、ビーディー23・1キューピー ノース・ヨークシャー、スキップトン、 アッショ・グローブ 2		
(72)発明者	バン・リューウェン・ピーター ドイツ連邦共和国、ディー-22397 ハン ブルグ、ドゥーベンステット、カーベンハ ナー・ウェグ・105エフ(番地なし)		
(72)発明者	ハーベイ・ウィルソン イギリス国、ビーディー23・3ディーダブ リュ ノース・ヨークシャー、スキップト ン、カールトン、ウェストウッド 53		

F ターム(参考) 4C076 AA09 AA11 AA77 AA78 BB13
BB21 BB31 CC19 CC31
4C081 AA12 AA13 AA14 BA11 BA12
BA14 BA16 CD11 CD12 CD15
CD18 CD27 CE11 DA02 DA05
DA12 DA14 DA15 DC03 DC15
EA15
4C084 AA02 AA03 DA41 DB52 DC10
NA10 ZA89 ZC54